

## NOVAS TÉCNICAS E APARELHAGENS

### MODIFICAÇÃO DO MÉTODO DE BIELSCHOWSKY-GROS PARA CORTES EM PARAFINA

JOSÉ FERNANDEZ \*

Contamos com numerosos métodos de impregnação para o estudo do sistema nervoso central e periférico, em condições normais e patológicas. Do conjunto destes métodos podemos destacar dois grandes grupos: o do nitrato de prata reduzido e o do óxido de prata amoniacal e suas numerosas variantes.

O nitrato de prata reduzido, método de Cajal<sup>13</sup> e variantes, embora possa ser aplicado em peças fixadas em formol (variantes com fixação em formol amoniacal, fixação em formol com ulterior tratamento pelo álcool amoniacal ou piridina), requer fixação especial para melhor rendimento; além disso não é aconselhável sua execução em material fixado há longo tempo. Como o material utilizado em anatomia patológica e mesmo em histologia é fixado em formol e como as peças cirúrgicas são enviadas ao laboratório fixadas em formol, o método de Cajal e variantes tem sua utilização bastante restringido. Vale, porém, acrescentar que, principalmente a variante proposta por Castro<sup>16</sup>, oferece aspectos de magnífica beleza e resultados constantes sempre que na execução os tempos sejam obedecidos com cuidado.

O óxido de prata amoniacal, método de Bielschowsky<sup>5</sup> e variantes, requer máximo cuidado na preparação do óxido de prata, pois um leve excesso de álcool prejudica bastante a impregnação. A variedade de Gros<sup>26</sup> oferece maiores vantagens que o processo original de Bielschowsky, por ser mais fácil a preparação do licor amoniacal e por permitir impregnação mais seletiva; além disso este método é controlável ao microscópio.

O método de Schultze<sup>42</sup>, além de exigir tratamento dos cortes pela soda em soluções de concentração variável, com ulterior tratamento pelo

---

\* Professor de Histologia e de Citologia da Faculdade Católica de Filosofia; Assistente da Faculdade de Medicina da Universidade da Bahia e da Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública; Anatomopatologista da Fundação Hospitalar "Octavio Mangabeira".

nitrate de prata também em soluções variáveis, apresenta os inconvenientes de não corar as finas arborizações nervosas e de oferecer dificuldade na determinação do grau de concentração da solução redutora. A variante de Bruno Lobo<sup>12</sup>, apesar de permitir bons resultados, oferece, praticamente, as mesmas inconveniências que o método original de Schultze. As melhores variações para o método de Gros foram propostas por Arteta<sup>4</sup> e Jabonero<sup>33</sup>, sendo os resultados, com estes métodos, mais constantes e melhor controlados que no método original. O método de Gros ou as variantes de Arteta e Jabonero devem ser sempre os de eleição quando a finalidade é o estudo das neurofibrilas ou a morfologia dos neurônios, porém estes métodos requerem cortes em congelação. Para a impregnação em blocos, em material fixado em formol, o método de escolha deve ser o de Boeke<sup>6</sup>.

As dificuldades são maiores quando queremos impregnar cortes em parafina e residem não só na escassez de métodos, como e principalmente, no grande número de manipulações e, ainda, na exigência de tempo bastante longo para a sua feitura, como é exemplificado pelo método aconselhado por Feyrter<sup>23</sup>. Com a finalidade de conseguir um método de fácil e rápido manejo, com vantagens pelo menos aproximadas às dos de Gros, Arteta e Jabonero, realizamos ensaios que, após inúmeras tentativas, foram parcialmente coroados de êxito e nos levam a publicar os primeiros resultados.

#### MATERIAL, MÉTODO E RESULTADOS

Nosso material compõe-se de gânglios de Gasser e de apêndices cecais normais. Os primeiros foram conseguidos em autópsias de indivíduos falecidos por causas diversas, os segundos em intervenções cirúrgicas realizadas para fim outro que não a remoção do órgão. O conceito de normalidade foi estabelecido mediante exames histológicos em preparações coradas pela hematoxilina-eosina e pelo tricrômio de Gomori. A fixação foi feita em formol neutro ou comercial a 10-20%, em formol-sonifeno ou em líquido de Bouin. Obtivemos bons resultados em material fixado em formol comercial a 10% durante 6 meses. A impregnação é precedida de preparador e de mordente e seguida por viragem em ouro.

O modus operandi é como segue:

- 1) Fixação em formol a 10-20%, neutralizado com carbonato de magnésio, durante 15 a 30 dias;
- 2) Inclusão em parafina seguindo o seguinte esquema: a) álcool absoluto, 1 hora; b) álcool absoluto, 1 hora; c) xilol (estufa a 56°), 30 minutos; d) xilol (estufa a 56°), 15 minutos; e) parafina, 15 minutos; f) parafina, 15 minutos; g) inclusão;
- 3) Cortes de 25 micra que se recolhem em xilol; nova passagem por xilol e imersão em álcool absoluto (2 banhos, 3-5 minutos em cada operação);
- 4) Hidratação dos cortes em solução de formol a 2% neutralizado com carbonato de magnésio e, eventualmente, sonifeno a 1%. Deve-se ter o cuidado para que durante a hidratação os cortes permaneçam submersos, pois, caso contrário, pode

haver rotura dos mesmos. Permanência neste banho preparador de, no mínimo, 10 minutos; maior tempo, 60 minutos ou mais, não prejudica a impregnação;

5) Lavar os cortes em água destilada, por 1-5 minutos;

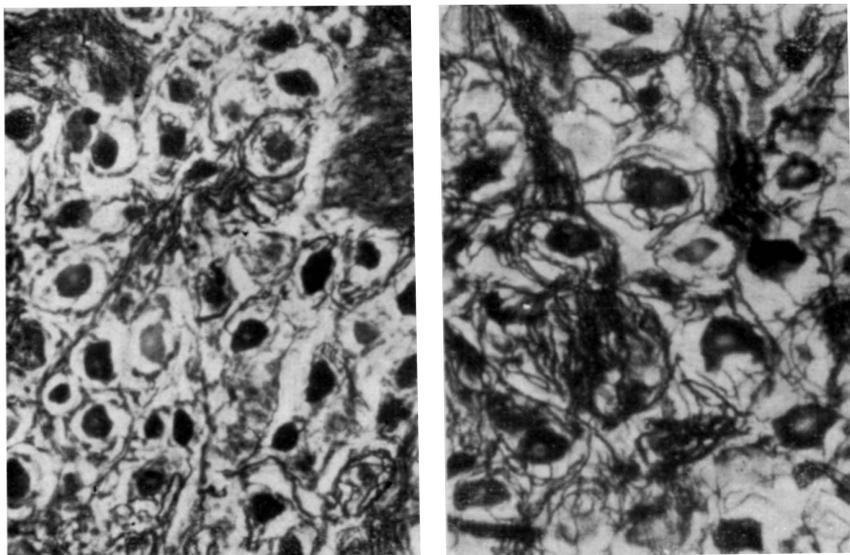
6) Imersão dos cortes no banho mordente constituído por uma solução recente de nitrato de prata a 10%, durante 15-60 minutos, ao abrigo da luz;

7) Lavagem rápida em água destilada (15-30 segundos) para retirar o excesso de nitrato;

8) Passagem dos cortes para uma solução de formol neutro em água corrente (solução a 10%) distribuída em quatro pequenos cristalizadores, passando sucessivamente os cortes de um a outro cristalizador, durando esta operação, no máximo, 10 minutos;

9) Lavagem rápida em água destilada (15-30 minutos) e imersão na solução de óxido de prata amoniacal feita da seguinte maneira: a uma solução de nitrato de prata a 10%, acrescentar amoníaco gôta a gôta até que o precipitado formado se dissolva sob a ação do próprio amoníaco, tendo-se o cuidado de não acrescentar excesso de álcali. Acrescentar, depois, uma gôta de amoníaco para cada 5 ml da solução de óxido de prata. A impregnação deve ser controlada ao microscópio.

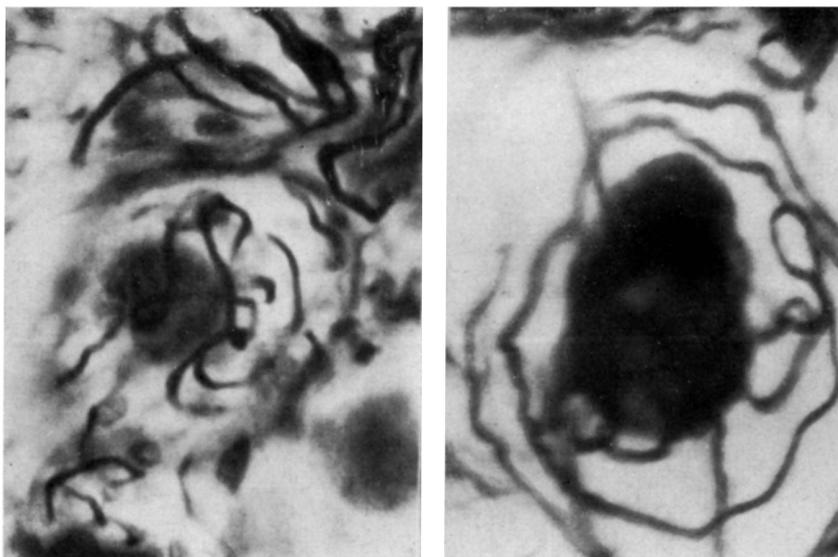
10) Conseguida a impregnação desejada, transporta-se os cortes para a água amoniacal (água destilada, 8 partes; amoníaco, 2 partes) com o fim de sustar a impregnação, durante 1-3 minutos;



*Fig. 1 — Gânglio de Gasser. Método de Bielschowsky-Gros modificado. Neurônio perfeitamente impregnado, com impregnação também das fibras nervosas e elementos conjuntivos (100 X).*

*Fig. 2 — Gânglio de Gasser. Método de Bielschowsky-Gros modificado. Neurônios perfeitamente impregnados; limpeza da preparação devido ao emprêgo do sonifeno (100 X).*

- 11) Passagem dos cortes para uma solução de ácido acético a 1-2%, durante 5-10 minutos;
- 12) Lavagem dos cortes em água destilada, durante 10-15 minutos;
- 13) Imersão dos cortes em cloreto de ouro segundo a fórmula aconselhada por Castro<sup>14</sup> (1 gota de ácido acético para cada 10 ml de uma solução de cloreto de ouro amarelo a 1/600), até que os cortes adquiram coloração violeta;
- 14) Passagem dos cortes em uma solução de hipossulfito de sódio e bissulfito de sódio (a cada 10 ml de uma solução de hipossulfito de sódio a 5%, acrescentar uma gota de bissulfito a 10%). Neste banho os cortes permanecem durante 3 a 5 minutos;
- 15) Passagem dos cortes para um cristalizador contendo água corrente. Lavar bem e montar como habitualmente.

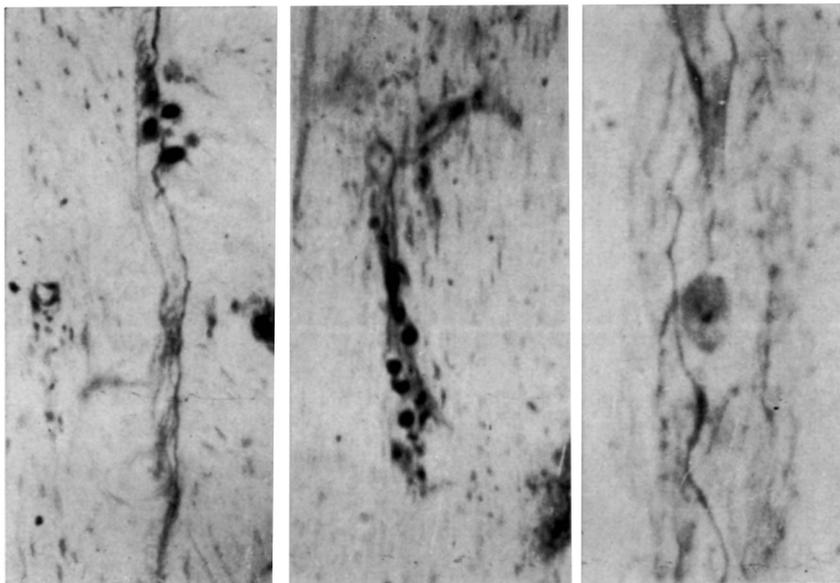


*Fig. 3 — Gânglio de Gasser. Método de Bielschowsky-Gros modificado. Neurônio bem impregnado que apresenta em volta manchas devidas a leve depósito de sal de prata nos elementos conjuntivos (450 X).*

*Fig. 4 — Gânglio de Gasser. Método de Bielschowsky-Gros modificado. Neurônio perfeitamente impregnado evidenciando prolongamento; limpeza da preparação devido ao emprêgo do sonifeno (450 X).*

Os resultados obtidos com a técnica descrita podem ser considerados bons. Devemos variar um pouco a técnica conforme se deseja impregnar centros nervosos, no caso gânglio de Gasser, ou terminações nervosas periféricas, no caso apêndice cecal. Para o primeiro é aconselhável hidratar os cortes com solução de formol com sonifeno. Quando usamos o banho preparador somente com o formol, obtemos coloração também de fibras conjuntivas, o que dá aos cortes aspecto mais compacto (figs. 1 e 3), quando utilizamos a solução preparadora formol-sonifeno, evita-

mos a impregnação do tecido conjuntivo, obtendo maior limpeza da preparação (figs. 2 e 4). Em se tratando de terminações periféricas, principalmente do aparelho digestivo, o sonifeno tem também indicação, pois favorece a impregnação das terminações e evita, dentro do possível, a das fibras conjuntivas e musculares que muito prejudicam a perfeita evidência dos filetes nervosos. As células claras de Feyrter são bem visualizadas na técnica descrita, podendo-se, muitas vezes, evidenciar a relação estreita entre elas e as fibras nervosas (figs. 5, 6 e 7). O banho preparador somente com formol, entretanto, também oferece bons resultados, quer nos centros nervosos, quer nas terminações periféricas. No gânglio de Gasser conseguimos boas figuras de células, fibras e terminações nervosas utilizando tal procedimento. No apêndice algumas vezes conseguimos, com tal procedimento, impregnar bastante bem o plexo nervoso fundamental (figs. 8, 9 e 10), muito embora o tecido conjuntivo e muscular ficassem também impregnados (fig. 11).



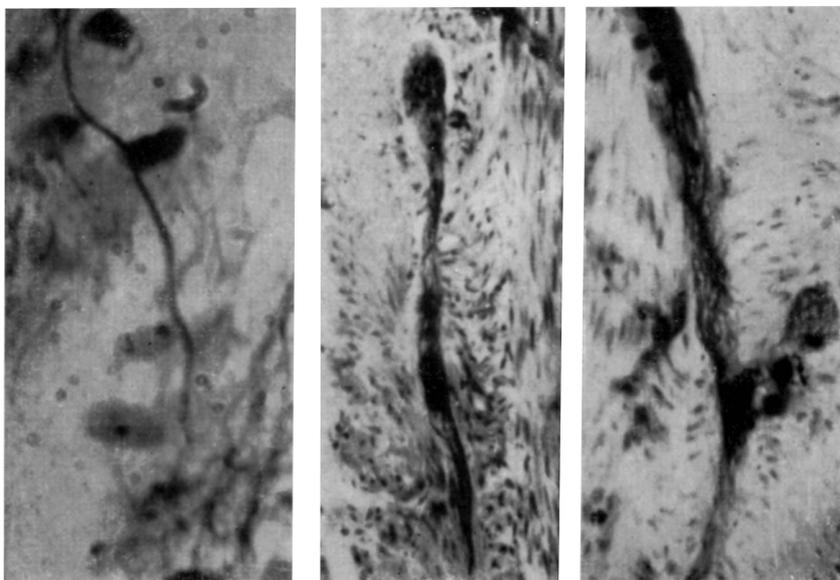
*Fig. 5 — Apêndice cecal. Método de Bielschowsky-Gros modificado. Fibra nervosa terminal envolvida por um plexo delicado e em íntima relação com células intersticiais (100 X).*

*Fig. 6 — Apêndice cecal. Método de Bielschowsky-Gros modificado. Grupo de elementos intersticiais em relação com um plexo simpático fundamental (100 X).*

*Fig. 7 — Apêndice cecal. Método de Bielschowsky-Gros modificado. Célula clara de Feyrter em íntima relação com um plexo fundamental (450 X).*

A variação aconselhada, em se tratando de terminações periféricas, não diz respeito somente ao emprego do sonifeno, como também, e isto é mais importante, porque utiliza impregnação mais intensa. Assim sendo os cortes de centros nervosos (gânglio de Gasser) permaneceram por menor tempo (10 a 20 minutos) na fórmula

mordente (nitrato de prata a 10%); os cortes de terminações nervosas, apêndice cecal no caso, permaneceram durante prazo maior (30 a 60 minutos). Quando utilizamos maior tempo de permanência dos cortes no líquido mordente, conseguimos boas figuras de terminações nervosas, com prejuízo da impregnação dos neurônios. Em um de nossos cortes, no qual o banho mordente foi prolongado por cerca de 60 minutos, conseguimos obter excelente figura de sinapse, no gânglio de Auerbach, na qual as terminações nervosas foram impregnadas com intensidade; porém os neurônios ficaram prejudicados em sua morfologia, não sendo possível ver as neurofibrilas ou outras estruturas, e apresentando-se a soma celular como uma grosseira



*Fig. 8 — Apêndice cecal. Método de Bielschowsky-Gros modificado. Plexo simpático fundamental perfeitamente impregnado (450 X).*

*Fig. 9 — Apêndice cecal. Método de Bielschowsky-Gros modificado. Plexo fundamental situado ao longo do limite entre as camadas musculares circular e longitudinal (100 X).*

*Fig. 10 — Apêndice cecal. Método de Bielschowsky-Gros modificado. Fibrilas terminais simpáticas que se dispõem formando rede de malhas estreitas (100 X).*

mancha (fig. 12). Usando o sonifeno, conseguimos impregnar, na camada muscular do apêndice cecal, uma célula clara de Feyrter em íntima relação com filetes nervosos (fig. 7); outras vezes observamos que grupos de células intersticiais mostravam íntimas relações com as delicadas fibrilas do plexo simpático fundamental (figs. 5 e 6), semelhantes às figuras descritas por Boeke<sup>7</sup> e por Stöhr<sup>43,41</sup>. Em uma das preparações, na qual a fixação foi feita com sonifeno, observamos, entre as camadas muscular, circular e longitudinal, na região do plexo de Auerbach, dois neurônios perfeitamente impregnados, mostrando a relação entre o seu soma e elementos

pequenos, esféricos e fortemente impregnados que se interpunham entre a célula e a fibra nervosa, servindo como elemento intermediário da sinapse (fig. 13).

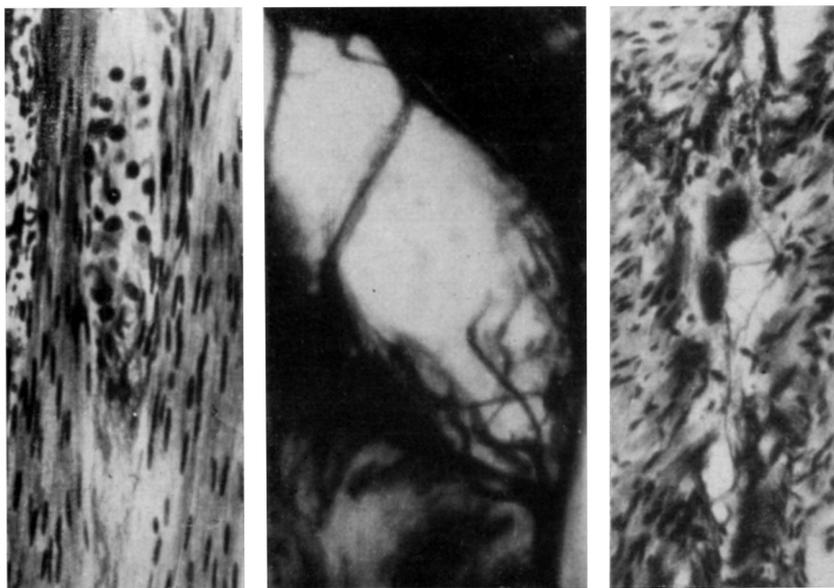


Fig. 11 — Apêndice cecal. Método de Bielschowsky-Gross modificado. Plexo simpático fundamental em plena camada muscular circular (100 X).

Fig. 12 — Apêndice cecal. Método de Bielschowsky-Gros modificado. Sinapse tipo axônio-dendrítica (450 X).

Fig. 13 — Apêndice cecal. Método de Bielschowsky-Gros modificado. Neurônios do tipo I de Golgi apresentando sinapse, através de elementos intercalares, com fibras nervosas (100 X).

#### COMENTÁRIOS

Os métodos de impregnação usados em histologia não são simples e, uns mais que outros, resultam muitas vezes em fracasso. Mesmo quando obtemos bons resultados, estes não são constantes, pois é conhecida a tendência dos métodos de prata em corar algumas vezes as células e em outras as fibras e terminações nervosas, não se sabendo ainda a que é devida a tendência para a impregnação ora em um, ora em outro sentido. As dificuldades da impregnação, entretanto, devem ser enfrentadas quando a finalidade é o estudo de certas estruturas ou formações complicadas, nas quais seria impossível descobrir filigranas se certos detalhes não se corassem mais fortemente e com certa seletividade. O importante é que as dificuldades das magníficas técnicas clássicas e algumas de suas variantes mo-

dernas não nos autorizam substituí-las por outras mais constantes, mas cujo resultado geralmente é medíocre. A simplicidade e a comodidade de um método histológico só é valiosa se a técnica utilizada fornecer figuras de real valor que permitam conclusões seguras.

No método que propomos, após o banho mordente, leva-se os cortes para um rápido banho em água destilada, tendo-se a máxima precaução neste tempo, pois a boa impregnação dêle depende. Não devemos abreviar o banho porque senão teremos a preparação cheia de precipitados, nem prolongá-lo demasiado já que isto fará com que as fibras percam, em grande parte, sua capacidade redutora. Os mesmos cuidados, por motivos idênticos, devem ser lembrados na lavagem que precede a imersão dos cortes no banho de prata amoniacal. A impregnação é feita pelo óxido de prata amoniacal, porém podemos substituí-lo, com bons resultados, por qualquer das modalidades de carbonato de prata usadas por Rio-Ortega<sup>38</sup>, por Foot<sup>25</sup>, por Arteta<sup>4</sup> ou Jabonero<sup>33</sup>. É aconselhável passar os cortes no óxido de prata amoniacal em grupos de dois a quatro, o que facilita o controle microscópico. A redução pode ser feita com solução de formol a 10% em água corrente, ou então, como aconselha Sanz-Ibañez<sup>40</sup>, em água rica em sais (água pesada); em ambos os casos os resultados são praticamente os mesmos. No que diz respeito à fixação, não resta a menor dúvida que o formol produz certa alteração no tecido, modificando as imagens das estruturas vivas, porém esta objeção pode ser feita a qualquer fixador. O formol em concentração de 10 a 20% é excelente fixador citológico, pouco alterante.

Nas últimas preparações que realizamos com o método acima proposto, conseguimos, em apêndices cecais, evidenciar claramente finas terminações vegetativas em tudo semelhantes às descritas por Bullon-Ramirez<sup>11</sup>; encontra-se, vez por outra, fibrilas com caráter protoplasmático, na camada muscular ou na submucosa, que seguem capilares sanguíneos, idênticas às figuras descritas por Stöhr<sup>43</sup> e por Jabonero<sup>31, 32</sup>.

A execução de métodos de impregnação para cortes em parafina exige tempo bastante longo, como ocorre, por exemplo, no de Feyrter<sup>23</sup>, no de Tinel<sup>45</sup>, no de Humphreys<sup>29</sup>, no de Romanes<sup>39</sup>, nos quais, além de imersão no banho impregnador por várias horas (12 a 48 horas), são necessárias manipulações prolongadas. Muito embora êstes métodos, em certas ocasiões, tenham dado ótimos resultados em mãos de alguns investigadores (Weddell e Zander<sup>46</sup>, Armstrong<sup>2</sup> e Polley<sup>36</sup>), as figuras obtidas são sempre inferiores em detalhes às que se consegue com os métodos de Jabonero, de Gros e de Arteta, como podemos ver nos resultados obtidos por vários pesquisadores (Stöhr<sup>43, 44</sup>, Aitken<sup>1</sup>, Bullon-Ramirez<sup>9, 10</sup>, Sanz-Ibañez<sup>17</sup>, Meyling<sup>35</sup>, Fernandez<sup>18, 19, 20, 22</sup>) usando o método de Gros<sup>21</sup>; nos resultados (Arteta<sup>4</sup>, Guillén<sup>27, 28</sup>, Bullon-Ramirez<sup>8</sup>, Fernandez<sup>21</sup>) usando o método de Arteta; ou nos resultados (Jabonero<sup>30, 33</sup>, Renzoni<sup>37</sup>) usando o método de Jabonero.

Na modificação que propomos, a principal vantagem reside na fácil manipulação e no breve tempo que a técnica requer; assim é que, se com os demais métodos de impregnação para cortes em parafina são necessárias 24 horas no mínimo, para a feitura do método por nós proposto, com apenas 4 a 5 horas podemos impregnar cerca de 30 a 40 cortes, o que consideramos excelente rendimento. Estas razões fazem da modificação proposta um método de grande exequibilidade.

#### RESUMO E CONCLUSÕES

É proposta uma modificação para o método de Bielschowsky-Gros a ser aplicado em cortes em parafina, utilizável no estudo de terminações nervosas centrais e periféricas. O método é de manipulação fácil e executável em poucas horas, ao contrário da grande maioria de métodos de impregnação em cortes de parafina. A impregnação é precedida de preparador e de mordente e seguida por viragem em ouro. O preparador utilizado é a solução de formol a 2% neutralizada com carbonato de magnésio, adicionada ou não a sonifeno a 1%. O emprêgo do sonifeno tem a vantagem de permitir impregnar mais vigorosamente as fibras e terminações nervosas e evitar ao máximo a impregnação das fibras conjuntivas, oferecendo perfeita limpeza da preparação. O mordente é constituído por uma solução recente de nitrato de prata a 10%, na qual os cortes permanecem por tempo variável, sendo aconselhável, para a coloração do plexo simpático fundamental, permanência prolongada (cerca de uma hora). A impregnação é feita em solução de óxido de prata amoniacal preparada como o recomenda Bielchowsky (solução de nitrato de prata a 10% acrescida de amoníaco até completa dissolução do precipitado formado), podendo ser substituída, com idênticos resultados, pelas soluções propostas por Rio-Hortega, Foot, Arteta e Jabonero. A viragem em ouro é feita utilizando a solução aconselhada por Castro (uma gota de ácido acético para cada 10 ml de solução de cloreto de ouro amarelo a 1/600).

Os resultados obtidos com o método proposto são satisfatórios. Conseguiu-se impregnar com perfeição neurônios do gânglio de Gasser; nas preparações com sonifeno, as fibras nervosas e os prolongamentos celulares apareciam perfeitamente impregnados e a preparação oferecia limpeza absoluta. No apêndice cecal as terminações nervosas resultavam perfeitamente impregnadas, contrastando, principalmente quando foi empregado o sonifeno, com os elementos musculares e conjuntivos. O plexo simpático fundamental, o retículo terminal de Stöhr, as finas terminações simpáticas mostravam relações estreitas com as células intersticiais, observando-se, também, boas figuras de sinapse. Com o método proposto é possível, em 4 ou 5 horas, impregnar cerca de 30 a 40 cortes, o que pode ser considerado excelente rendimento.

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

*Bielschowsky-Gross' method modification for paraffin cuts*

A modification is proposed for the Bielschowsky-Gross' method to be used in paraffin cuts for the neurofibrils and the peripheral nerve endings. The method is easy to perform and can be accomplished in a few hours, what cannot be said of most of impregnation methods for paraffin cuts.

The fixation is performed with a 2% formalin solution neutralized with magnesium carbonate, either or not combined with 1% Somniphène solution; the use of Somniphène affords a more vigorous impregnation of the fibers and avoids, up to the maximum, the impregnation of conjunctive fibers. The mordantage is made up with a recent 10% silver nitrate solution, a prolonged fixation (about one hour) being advisable for the coloration of the fundamental sympathetic plexus. The impregnation is made up with ammoniacal silver oxide solution prepared after Bielschowsky's recommendations (addition of ammonia to a 10% silver nitrate solution until complete dissolution of precipitate), which can be substituted by the solutions proposed by Rio-Hortega. Arteta and Jabonero. Toning (gold turn-over) is performed with the solution recommended by Castro (one drop of acetic acid for every 10 ml of 1/600 yellow gold chloride solution).

The results were satisfactory, a perfect impregnation of neurons of the Gasser ganglion being achieved; in preparations with Somniphène the nervous fibers and the cell processes appeared perfectly impregnated and the preparations showed an absolute cleanliness. In the coecal appendix the nerve endings were also perfectly impregnated, contrasting with muscular and conjunctive elements, specially when Somniphène was employed. The fundamental sympathetic plexus, Stöhr's terminal reticulum and the thin sympathetic endings showed close relations to the interstitial cells, with good synaptic pictures.

With this proposed method it is possible to impregnate, in 4 to 5 hours, about 30-40 cuts and this can be considered an excellent work profit.

## BIBLIOGRAFIA

1. AITKEN, J. T. — Growth of nerve implants in voluntary muscle. *J. Anat.*, 84:38-49, 1950.
2. ARMSTRONG, J. A. — An experimental study of the visual pathways in a reptile (*Lacerta vivipara*). *J. Anat.*, 84:146-167, 1950.
3. ARTETA, J. L. — Anatomía patológica e histopatología de la llamada glositis pelagrosa. *Trab. Inst. Cajal Inv. Biol.*, 34:65-136, 1942.
4. ARTETA, J. L. — Nueva técnica de impregnación orgánica, especialmente aplicable a secciones de órganos del sistema nervioso. *Trab. Inst. Cajal Inv. Biol.*, 36:289-304, 1944.
5. BIELSCHOWSKY, M. — In I. Bertrand. *Techniques Histologiques de Neuropathologie*. IV. Les méthodes neurofibrillaires. Masson et Cie., Paris, 1930, págs. 167-172.
6. BOEKE, J. — Die motorische Endplatte bei den höheren Vertebraten, ihre Entwicklung, Form und Zu-

- sammenhang mit der Muskelfaser. *Anat. Anz.*, 35:193-226, 1909. 7. BOEKE, J. — Le plexus fondamental sympathique et les cellules interstitielles. *Ann. d'Anat. Pathol.*, 16:961-995, 1939-1940. 8. BULLÓN-RAMÍREZ, A. — Contribución al conocimiento de la citoarquitectura del plexo de Auerbach del recto. *Trab. Inst. Cajal Inv. Biol.*, 39:253-272, 1947. 9. BULLÓN-RAMÍREZ, A. — Contribución al conocimiento de la estructura de los plexos intramurales del tubo digestivo. *Anal. Univ. Hispalense (Sevilla)*, 15:75-92, 1954. 10. BULLÓN-RAMÍREZ, A.; STIEREL, E. — Ueber die efferente Innervation der glatten Muskulatur. *Acta neuroveget.*, 12:376-388, 1955. 11. BULLÓN-RAMÍREZ, A. — Experimentelle Studien ueber die Innervation des kleinen Blutgefässe. *Acta neuroveget.*, 14:133-147, 1956. 12. BRUNO LOBO, F. — *In* M. C. Fernandes. Métodos Escolhidos de Técnica Microscópica. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1943, págs. 420-425. 13. CAJAL, S. R.; CASTRO, F. de — Elementos de Técnica Micrográfica del Sistema Nervioso. Tip. Artística, Madrid, 1933, págs. 180-192. 14. CAJAL, S. R.; CASTRO, F. de — Elementos de Técnica Micrográfica del Sistema Nervioso. Tip. Artística, Madrid, 1933, págs. 192 e 193. 15. CASTRO, F. de — Contribución al conocimiento de la inervación parasimpática y simpática del estómago. *Anal. R. Acad. Nac. Medicina (Madrid)*, 67:383-450, 1950. 16. CASTRO, F. de — Quelques formules de fixation pour la méthode de l'argent reduit de Cajal et leurs résultats dans les centres nerveux et les terminaisons nerveuses périphériques. *Trav. Lab. Rech. Biol. Univ. Madrid*, 23:427-442, 1925. 17. CORRATO-IBÁÑEZ, A. — Sobre la inervación vegetativa del oído interno. *Trab. Inst. Cajal Inv. Biol.*, 35:185-204, 1943. 18. FERNÁNDEZ, J. — Morfopatología de los ganglios simpáticos lombares. Tesis doctoral, Madrid, 1954. 19. FERNÁNDEZ, J. — Contribuição ao estudo da histologia normal do sistema nervoso periférico. Tese de doutoramento, S.A. Artes Gráficas, Salvador (Bahia), 1955. 20. FERNÁNDEZ, J. — Morfopatologia dos gânglios simpáticos lombares na tromboangeite obliterante. *Rev. da Ass. Méd. Brasil.*, 2:237-242, 1956. 21. FERNÁNDEZ, J. — Histopatologia do gânglio estrelado na tuberculose pulmonar. *Arq. Neuro-Psiquiat.*, 15:1-14, 1957. 22. FERNÁNDEZ, J. — As formações em bolas argênticas do sistema nervoso simpático. *Arq. Neuro-Psiquiat.*, 15:190-203, 1957. 23. FEYRTER, F. — Ueber die Pathologie der Vegetativen Nervosen Peripherie und ihrer Ganglionaren Regulationsstätten. Verlag Wilhelm Maudrich, Wien, 1951. 24. FILATOWA, A. G.; LAWRENTIEW, B. L. — Ueber die pathologische Histologie der Nerven und Ganglien bei Kehle und Lungentuberkulose. *Virchow's Archiv*, 286:1-10, 1932. 25. FOOT, N. C. — Useful methods for the routine examination of brain tumors. *Am. J. Path.*, 14:245-252, 1938. 26. GROS, V. — *In* W. C. Gibson. Silver methods for boutons terminaux and neurofibrils. McClug's Handbook of Microscopical Technique. Paul B. Hoeber, Inc., Third Ed., New York, 1950, págs. 389-398. 27. GUILLÉN, M. F. — Sobre la inervación de la amígdala palatina. *Trab. Inst. Cajal Inv. Biol.*, 42:71-102, 1950. 28. GUILLÉN, M. F. — Lesiones nerviosas en la laringe tuberculosa: posible papel patogenico. *Trab. Inst. Cajal Inv. Biol.*, 43:85-144, 1951. 29. HUMPHREYS, S. P. — A method for the impregnation of perivascular nerves on intracerebral blood vessels. *Am. J. Path.*, 15:151-153, 1939. 30. JABONERO, V. — Neurohistologische Beobachtungen an den menschlichen Augenhauten beim Roentgenlucoma. *Acta neuroveget.*, 13:18-49, 1955. 31. JABONERO, V. — Efferente Innervation der Blutgefässe. *Acta neuroveget.*, 14:16-26, 1956. 32. JABONERO, V. — Innervation efférente des vaisseaux sanguins. *Cardiologia*, 19:209-247, 1951. 33. JABONERO, V.; GOMEZ, B.; BORDALLO, F.; PEREZ CASAS, J. — Organización Anatómica del Sistema Neurovegetativo Periférico. Instituto Nacional de Ciencias Médicas, Madrid, 1951. 34. LAWRENTIEW, B. I.; FILATOWA, A. G. — Histopathologie du nerf laryngé inférieur et de ses terminaisons au cours de la laryngite tuberculeuse. *Trab. Lab. Rec. Biol. Univ. Madrid*, 29:319-338, 1934. 35. MEYLING, H. A. — Structure and significance of peripheral extension of autonomic nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 99:495-543, 1953. 36. POLLEY, E. H. — Method for silver staining of nerve fibres in whole-mount preparations of blood vessels. *Science*, 112:278-279, 1950. 37. RENZONI, A. — Il plesso di Auerbach nella doccia esofagea dei ruminant. *Arch. Ital. Anat. e Embriol.*, 61:17-33, 1956. 38. RIO-HORTEGA, P. — El metodo del carbonato argéntico. Revisión general de sus tecnicas y aplicaciones en histologia normal y patologica. *Arch. Histol. Norm. y*

Pathol., 1:165-205, 1942. 39. ROMANES, G. J. — Staining of nerve fibres in paraffin section with silver. J. Anat., 84:104-115, 1950. 40. SANZ IBANEZ, J. — Poliomiellitis Experimental. Tip. Artistica, Madrid, 1944. 41. SANZ IBANEZ, J. — Alteraciones del sistema nervioso central y periferico por el virus de Theiler. Trab. Inst. Cajal Inv. Biol., 43:1-21, 1951. 42. SCHULTZE, C. — In I. Bertrand. Techniques Histologiques de Neuropathologie. IV. Les méthodes neurofibrillaires. Masson et Cie., Paris, 1930, págs. 176-179. 43. STÖHR, Ph. — Mikroskopischer Beitrag zur Innervation der Blutkapillären beim Menschen. Ztschr. Zellforsch. u. Mikr. Anat., 3:431-448, 1926. 44. STÖHR, Ph. — Mikroskopische Studies zur Innervation des Magendarmkanales. Ztschr. Zellforsch. u. Mikr. Anat., 21:243-278, 1934. 45. TINEL, J. — Technique d'imprégnation argentique des fibres nerveuses sur coupes à la paraffine. C. R. Soc. Biol., 141:698-700, 1947. 46. WEDDELL, G.; ZANDER, E. — Critical evaluation of methods used to demonstrate tissue neural elements, illustrated by reference to cornea. J. Anat., 84:168-195, 1950.

*Fundação Hospitalar "Octavio Mangabeira" — Departamento de Anatomia Patológica — Salvador, Bahia, Brasil.*